

**VERGLEICHENDE ELEKTROPHORETISCHE
UNTERSUCHUNGEN VON SEKRETEN
GESUNDER UND KRANKER MENSCHLICHER
OHRSPEICHELDRÜSEN MITTELS DISK-
UND IMMUNELEKTROPHORESE**

Albert Kerscher

1970

Aus der Klinik für Hals- Nasen- Ohren- Kranke
der Universität München

Direktor : Professor Dr. med. H.H. Naumann

VERGLEICHENDE ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
VON SEKRETEN GESUNDER UND KRANKER MENSCHLICHER
OHRSPENCHELDREUSEN MITTELS DISK- UND IMMUNELEKTRO-
PHORESE.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Albert Kerscher

aus

Moosburg

München 1978.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr.med. H. Eichner

Mitberichterstatter : Prof. Dr.med. H.H. Naumann

Dekan : Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 14. März 1978.



Mein Dank gilt

Herrn Professor Dr. H.H. Naumann

für seine großzügige Unterstützung und Förderung.

Für die Überlassung des Themas und das Interesse
an dieser Arbeit möchte ich

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Eichner

besonders danken.

Für die wertvolle Unterstützung und Mithilfe
bedanke ich mich bei

Herrn Professor Dr. K. Hochstrasser

Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Bretzl

sowie den Mitarbeitern und Angestellten des
Forschungslabors Prof. Dr. K. Hochstrasser.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung	1
II.	Theoretische Grundlagen	
A.	Diskelektrophorese	3
B.	Immunoelektrophoretische Auftrennungen, zweidimensional nach LAURELL, modifiziert nach CLARKE und FREEMAN.	5
III.	Experimentelle Untersuchungen	
A.	Material und Methodik	8
1.	Patientengut	8
2.	Abnahmetechnik	8
3.	Aufbereitung der Sekrete	8
4.	Diskelektrophoretische Auf- trennung	9
5.	Immunoelektrophoretische Auf- trennungen	12
B.	Ergebnisse	
1.	Diskelektrophoretische Auftrennung	17
2.	Immunoelektrophoretische Auf- trennungen	27
C.	Diskussion der Ergebnisse	39
IV.	Zusammenfassung	42
	Literaturverzeichnis	43

I E i n l e i t u n g :

Zur Diagnostik der Ohrspeicheldrüsenenerkrankungen stehen uns neben der klinischen Untersuchung die radiologischen Untersuchungsmöglichkeiten sowie die Thermographie zur Verfügung. Sehr wenig werden biochemische Untersuchungsmöglichkeiten des Sekretes als Diagnostik verwandt. In der Literatur werden vereinzelt Elektrolytbestimmungen bei Ohrspeicheldrüsenentzündungen angeführt. Im übrigen werden Speichelveränderungen hauptsächlich bei Allgemeinerkrankungen beschrieben. In einer Reihe von biochemischen und physiologischen Untersuchungen ist die Proteinzusammensetzung beschrieben. Diese Ergebnisse wurden allerdings von Mischspeichel oder Sammelspeichel normaler Drüsensekrete gewonnen. Auch über die Isolierung einzelner Proteinfractionen wird von vielen Arbeitskreisen berichtet. ARMSTRONG, 1971 (2), BALEKJIAN, 1972 (3), BRANDTZAEG, 1971 (4), CHAUNCEY, 1954, 1957 (6), KAUFFMAN u.a., 1970 (15), MANDEL und ELLISON, 1961, 1965 (21), MASSON u.a., 1965 (23), MORIYA u.a., 1965 (26), TOMASI, 1963, 1968 (37), WOLF und TAYLOR, 1964, 1967 (41).

Untersuchungen über Veränderungen pathologischer Ohrspeicheldrüsensekrete hinsichtlich der Eiweißzusammensetzung sind jedoch bisher noch wenig erforscht worden. Bei den einzelnen Eiweißuntersuchungsmethoden finden

hauptsächlich folgende Techniken ihre Anwendung:

- a) Moving-boundary-Elektrophorese (ZIPKIN, ADAMIK, SAROFF 1957 (43) ; GELLER, HAMES, ROVELSTAD, 1959 (18) ; PATTON und PIGMAN, 1959 (28)).
- b) Papierelektrophorese (WEINSTEIN, HESKINS, JACKSON, 1960 (39) ; MANDEL und ELLISON, 1961 (21) ; ZIPPEL, MEYER, BIETZ, 1968 (44)).
- c) Zellulose-Acetat-Elektrophorese (D'SILVA und FERGUSON, 1962 (8)).
- d) Diselektrophorese in Polyacrylamidgelen (MEYER und LAMBERTS, 1965 (25) ; GIFFORD und YUKNIS, 1965 (14) ; STEINER und KELLER, 1968 (34) ; CALDWELL und PIGMAN, 1965 (5)).
- e) Immunelektrophorese (STOFFER, KRAUS, HOLMES, 1962 (6) ; SIMONS, 1964 (32) ; ELLISON, 1966 (8) ; LEVINE und ELLISON, 1973 (20)).

In dieser Arbeit sollen mittels der beiden letztgenannten Methoden, der Diskelektrophorese und der Immunelektrophorese, gesunde und erkrankte Ohrspeicheldrüsensekrete untersucht und verglichen werden.

II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.

A. Diskelektrophorese.

Die Diskelektrophorese ist zur Auftrennung von Proteinen und Protein-Carbohydrat-Komponenten des menschlichen Speicheldrüsensekrets gut geeignet. ROBERT CALDWELL und WARD PIGMAN (1965)(5) entwickelten die Diskelektrophorese mit Polyacrylamidgelen zur Auftrennung von Speichelkomponenten.

In der Diskelektrophorese liegt hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammenfassung und Gelporengröße ein diskontinuierliches Trennungssystem vor, in dem das Polyacrylamidgel als Trägergel fungiert.

Aufgrund zweier physikalischer Effekte erreicht die Diskelektrophorese ihr Auflösungsvermögen.

- a) Der Konzentrierungseffekt nach den theoretischen Grundlagen der Kontinuitäts- oder Regulationsfunktion nach KOHLRAUSCH entsteht durch Verwendung von Pufferpaaren unterschiedlicher pH-Werte und erbringt vor Trennbeginn schmale, sehr hoch konzentrierte Startzonen, die für scharfe Trennungen Voraussetzung sind. Die Konzentrierung der Proteinlösung erfolgt durch Beweglichkeitsunterschiede der beteiligten Ionen.

b) Der Molekularsiebeffekt:

Gele zeichnen sich durch hohe Viskosität und damit durch hohen Reibungswiderstand aus. Wandernde Teilchen erfahren daher, je nach ihren Dimensionen unterschiedliche Reibungswiderstände. Die Moleküle werden elektrophoretisch, also nicht nur nach ihrer elektrischen Ladung, sondern auch nach ihrer Molekülgröße, Molekulargewicht und Molekülgestalt (Tertiärstruktur) getrennt. Der Molekularsiebeffekt kommt aber nicht in allen Gelarten zur gleichen Wirkung: Während er in Polyacrylamid- und Stärkegenen vorherrscht, ist er im Agargel unterdrückt. Polyacrylamidgele haben den weiteren Vorteil ein synthetisches Polymerisationsprodukt und damit immer gleich reproduzierbar zu sein. Ferner sind sie in einem Konzentrationsbereich von 2 - 30 % zu verwenden, ohne ihre Transparenz zu verlieren. Damit ist die Dichte des Gelgitterwerkes bzw. die Porengröße in einem weiteren Bereich veränderbar.

B. Immunelektrophoretische Auftrennungen.

Zweidimensional nach LAURELL, modifiziert nach
CLARKE und FREEMAN.

Die Methode der zweidimensionalen Immunelektrophorese geht auf eine frühere Arbeit von RESSLER (1960) (30) zurück, deren Problematik von LAURELL (1965) wieder aufgegriffen wurde und schließlich von CLARKE und FREEMAN (1968) weiter modifiziert und zu einem quantitativen Verfahren ausgearbeitet wurde.

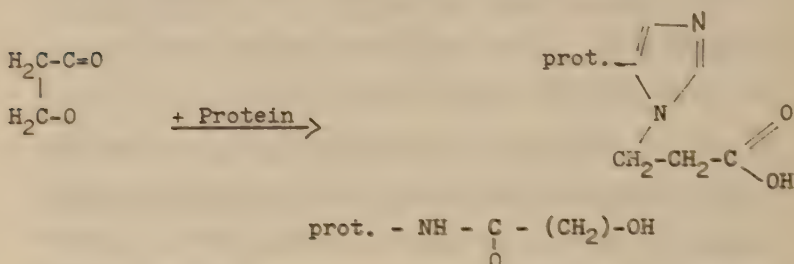
Im Prinzip ist diese Methode eine Kombination der einfachen Agargel-Elektrophorese mit der Elektroimmundiffusion. In der ersten Dimension werden die zu untersuchenden Proteingemische in einem antikörperfreien Agargel elektrophoretisch aufgetrennt, während in der zweiten Dimension eine quantitativ auswertbare Immunpräzipitation in einem Agargel erfolgt, das ein oligo- oder polyspezifisches Antiserum enthält.

1. Auftrennung in der ersten Dimension.

Unter Einwirkung eines Gleichstromfeldes kommt es nach Auftragen des Antigens zur Auftrennung der Speichelproteine. Die Wanderungsgeschwindigkeit bei gegebener Porengröße des Gels und gegebener Spannung, ist abhängig von Größe, Form, Konzentration und Ladung der Proteine.

Um eine einheitliche anodische Wanderungstendenz zu erreichen, ist vorher eine Modifizierung der Proteinprobe mit β -Propiolacton durchzuführen. (STEPHAN und FRAHM, 1971) (33).

Als acylierendes Agens reagiert β -Propiolacton vor allem mit dem Histidin und Lysin der Speichelproteine.



Hierbei wird die negative Ladung und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld erhöht.

Die β -Propiolacton-Konzentration wird so gewählt, daß man den gewünschten Effekt erreicht, ohne die immunologischen und anderen biologischen Eigenschaften des Speichels zu verändern.

Durch die Reaktion von β -Propiolacton mit den Serumproteinen tritt eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Verschiebung der einzelnen Serumfraktionen zueinander auf.

2. Auftrennung in der zweiten Dimension.

Die nun im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Proteingemische wandern nach Anlegen der Spannung in die Antikörper-Agarose und werden dort jeweils von den homologen Antigenen präzipitiert.

Mit Sicherheit erfolgt eine Präzipitation am Äquivalenzpunkt; darüber hinaus finden sich Präzipitationserscheinungen innerhalb eines bestimmten Bereiches, der sog. Äquivalenzzone. Die Schärfe dieser Zone nimmt mit der Reinheit des Antigens zu.

Entscheidend für die gute Entwicklung der Präzipitationslinien ist das optimale Verhältnis zwischen der Konzentration des Antigens und dem Titer des Antikörpers.

Die Fläche bzw. Höhe jedes Proteinpaaks ist der Konzentration des entsprechenden Antigens direkt proportional. Sie ist umgekehrt proportional der Antikörperkonzentration.

III. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN.

A. MATERIAL UND METHODIK:

1. Patientengut:

Insgesamt wurden zunächst 20 Normalpersonen untersucht, männlichen und weiblichen Geschlechts im Alter von 18 bis 61 Jahren. An pathologischen Drüsenbefunden wurden im Anschluss daran 30 Patienten mit Parotistumoren, 15 Patienten mit Sialadenitiden sowie 12 Patienten mit Sialadenosen untersucht.

2. Abnahmetechnik:

Das Drüsensekret wurde nach Sondierung des Ductus parotideus mit einem Polyvinylkatheter gewonnen. Die Drüsen wurden dabei immer simultan sondiert, d.h. die gesunde und die erkrankte Drüse untersucht. In der Regel wurde Ruhesekret abgenommen über einen Zeitraum von 30 bis 60 Minuten. Zum Vergleich wurde Ascorbinsäurelutschtabletten stimuliertes Sekret abgenommen.

3. Aufbereitung der Sekrete:

a) Zentrifugieren:

Zuerst wurde der Speichel 15 Minuten bei 3600 U/min zentrifugiert um Zellreste und sonstige Verunreinigungen zu entfernen.

b) Modifikation:

Darauf wurde der Speichel zu gleichen Teilen mit TRA-Puffer versetzt. Nach Zugabe von β -Propiolacton ($8 \mu\text{l}$ pro 1 ml Speichel plus 1 ml TRA-Puffer) erfolgte eine 2-stündige Inkubation der Sekretproben in einem 37° temperiertem Wasserbad.

c) Druckdialyse:

Um die Salze aus der Lösung zu entfernen und zugleich eine Konzentrierung zu erreichen, wurde eine 10 - 12-stündige Druckdialyse in Kollodiumhülsen durchgeführt. Dabei wurden 2 ml Speichel auf $50 \mu\text{l}$ konzentriert.

4. Diselektrophoretische Auftrennung:

a) Herstellung der Grundlösungen zur Acrylamidgelbereitung:

Zur diselektrophoretischen Auftrennung wurde ein 7,5 %iges Mittelporgel pH 8,9 verwandt, welches Proteingemische von Molekulargewichten von 10^4 bis 10^6 auftrennt und dessen optimaler Bereich Molekulargewichte von 3×10^4 bis 3×10^5 umfaßt, d.g. gut geeignet für Serumproteinauftrennung ist.

Es wurden drei Grundlagen benötigt:

- | | |
|-----------------|------------------|
| 1) 48 ml 1n HCL | 2) 30g Acrylamid |
| 36,6 g Tris | 0,8 g Bis |
| 0,8 g Temed | |
- 3) 60 mg/100 ml Ammoniumperoxidsulfat

(Die Lösungen 1 und 2 können vorrätig gehalten werden, Lösung 3 muß frisch hergestellt werden.)

Lös. 1, Lös. 2 und Aqua dest. wurden im Verhältnis 1:2:1 zusammengegeben. Diese Mischung wurde erst unmittelbar vor dem Gießen der Gelröhrchen mit Lös. 3, die Katalysatorwirkung besitzt, im Verhältnis 1 : 1 angesetzt und mußte dann sofort verwendet werden.

b) Herstellung von Pufferlösungen:

6 g Tris und 8,8 g Glycin wurden zu einer 10%-igen wässrigen Pufferlösung mit eingestelltem pH 8,3 verarbeitet. Puffer 1 enthielt gegenüber Puffer 2 Thymolblau in 0,001%iger Lösung zur Markierung des Laufes.

c) Herstellung der Färbelösung:

1%-ige Coomassielösung wurde mit 10%iger Trichlor-essigsäure im Verhältnis 1 : 19 versetzt und filtriert. Pro Gel wurden ca. 20 ml Färbelösung benötigt. Nach einmaligem Gebrauch wurde die Lösung verworfen.

d) Gießen der Gele:

Die gesäuberten Röhrchen (Laborwaschlös., Aqua dest.-Spülungen, Ofentrocknung) wurden einseitig mit Parafilm verschlossen, mit dem gießfertigen Gel gefüllt und mit 3 mm Wasser überschichtet. Damit wurde der für die Polymerisation nötige Luftabschluß erreicht. Die Mischung benötigte ca. 2 h zur Polymerisation. Nach Prüfung der Gelkonsistenz wurde das Wasser abgesaugt und die Testlösung aufgebracht.

Es wurden 100 μ l Nativspeichel, der zentrifugiert worden war, aufgetragen. Anschließend wurde die aufgetragene Substanz vorsichtig mit Puffer 1 überschichtet. Beide Kammern der Apparatur wurden mit Puffer aufgefüllt, die obere mit Puffer 1, die untere mit Puffer 2.

e) Elektrophoreseablauf:

Vorlauf: 10 min bei einer Stromstärke von 2 mA/Röhrchen.

Hauptablauf: 60 min bei 5 mA/Röhrchen.

Nach Abschluß des Laufes wurden die Gele aus dem Röhrchen entfernt. Dazu wurde eine lange dünne Kanüle vorsichtig zwischen Glaswand und Gelschicht geschoben und Glycerinwasserlösung injiziert, solange bis sich die Gele von der Wand lösten. Die Gele wurden in mit

10%-iger Trichloressigsäure gefüllte Reagenzgläser gegeben und 15 min zur Denaturierung der Proteinbestandteile gewaschen.

f) Färbung und Entfärbung der Gele:

Nach Entfernen der Trichloressigsäure wurden die Gele 24 h in Coomassielösung gelegt.

Zur Entfärbung der nicht an Protein adsorbierten Farbe wurden die Gele in 6%-iger Essigsäurelösung 24-28 h entfärbt.

Dieser Vorgang wurde durch Spülung in offenen Metallnetzen beschleunigt.

Die Entfärbelösung wurde mehrmals erneuert.

g) Aufbewahrung der Gele:

Zur Aufbewahrung wurden die Gelstangen in dünne mit 7%-iger Essigsäurelösung gefüllte Glasröhrchen gegeben und luftdicht verschlossen. In diesem Zustand konnten die Gele photographisch oder densiometrisch dokumentiert werden.

5. Immunelektrophoretische Auftrennungen:

a) Herstellung des Laufpuffers:

41,2 g Barbitat-Natrium (5,5 Diäthylbarbitursäure-Natrium-Salz) und 8,0 g Barbitat (5,5, - Diäthyl-

barbitursäure) werden in 10 l Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 8,6 eingestellt. Die Ionenstärke der Lösung beträgt dabei 0,02 y.

b) Herstellung des Agarosegels; pH-Wert 8,6:

1,5 g Agarose (Behringwerke) werden in 100 ml Barbitalspuffer pH 8,6 nach Zugabe von 10 mg Thiacid zur Wachstums-
hemmung der Mikroorganismen bis zur Homogenisierung der Lösung im Wasserbad gekocht.

c) Herstellung der Färbelösungen "Coomassie Brilliant Blue R:"

10 g Coomassie Brilliant Blue R

900 ml Äthanol 96 %

200 ml Eisessig und

900 ml Aqua dest. werden vermischt und zur Entfernung des Farbüberschusses filtriert.

d) Herstellung der Entfärbelösung:

4,5 l Äthanol 96 %

1,0 l Eisessig wurden mit

4,5 l Aqua dest. gemischt.

Durch Behandlung mit Aktivkohle wurde das Entfärbes-
bad für den wiederholten Gebrauch regeneriert.

e) Herstellung von Gelplatten:

Die Gläser von der Größe 5 x 10 cm werden zuerst mit Chloroform gereinigt und beschriftet. Auf dem Horizontaltisch wird je 10 ml auf 80°C abgekühlte Agaroselösung aufgezogen.

Nach dem Erstarren der Flüssigkeit erfolgte die Auftrennung der Gelbereiche in das Trenngel und dem späteren Präzipitationsbereich.

Ein ca. 1 cm breiter Streifen längs der Glasplatte dient als Trenngel. Darauf wird ein Loch ($\emptyset$ 4 mm) 1/2 cm vom Rand entfernt in das Trenngel als Auftragsstelle gestanzt.

f) Auftragen des dialysierten Speichels:

20 - 25 μ l des zentrifugierten, modifizierten und dialysierten Speichels werden in das gestanzte Loch gegeben (Proteinmenge von ca. 1 ml Speichel). Um den Elektrophoreseablauf überprüfen zu können, wird das Albumin mit Bromphenolblau markiert.

g) Elektrophoreseablauf: 1. Dimension:

Als Kontakt zwischen Gelplatten und E-Puffer dienen 0,3 mm dicke, doppelt gefaltete Filterpapierstreifen. Die Wanderung der modifizierten Parotisproteine erfolgt im alkalischen Bereich pH 8,6. (Barbitalpuffer pH 8,6 $y = 0,02$ von der Kathode zur Anode). Die

Ausgangsspannung am Gleichrichter beträgt 450 V. Feldstärke 8 - 10 V/cm. Stromstärke je nach Plattenzahl. Der Lauf dauert ca. 90 min bei Wasserkühlung.

h) Angießen des antiserumhaltigen Gels und Auftrennung in der zweiten Dimension:

Nach der Auftrennung der Proteine wird nur der als Trenngel verwendete 1 cm breite Agaroseanteil auf der Platte belassen. Der Rest wird entfernt, der nicht beschichtete Plattenteil wird gesäubert und getrocknet. 500 μ l Anti-Parotis-Sekretserum bzw. 200 μ l Anti-Tumor-Serum werden zu 8 ml, der auf mindestens 56°C abgekühlten Agaroselösung zugemischt und auf das Trenngel gegossen. Nach Erstarren des Gels werden die Platten im rechten Winkel zur ersten Laufrichtung auf die Trägerplatte der Apparatur zurückgelegt und mit neuem Filterpapier versehen. Die Kammern enthalten wie bei der 1. Dimension Barbitallpuffer 8,6 pH. Die Wanderung der Proteine erfolgt wieder von Kathode zur Anode. Die Ausgangsspannung am Gleichrichter beträgt 220- 250 V. Feldstärke 2 - 3 V / cm. Die Laufdauer beträgt 7-8 h unter Wasserkühlung.

i) Trocknung der Gläser:

Das sonst übliche 2-3 tägige Auswaschen der Agaroseplatten in physiologischer Kochsalzlösung wurde nicht durchgeführt, weil durch diesen Verzicht keine Beeinträchtigung der Abbildungsqualität festgestellt werden konnte, andererseits aber die Versuchsdauer beträchtlich verkürzt wurde. Es wurden also die Gelplatten sofort nach dem 2. Lauf mit Filterpapier abgedeckt. Darauf wurde als saugfähige, druckausgleichende Zwischenlage eine ca. 2 cm dicke Schicht aufgelegt, mit einer Glasplatte abgedeckt und mit ca. 3 kg Gewicht beschwert. Der Zellstoff wird 2 - 3 mal durch neue, trockene Zellstoffschichten ersetzt, so daß dem Gel mit dem Wasser auch die nicht präzipitierten Proteine und Salze zum größten Teil genommen werden, welche die Abbildung verschleiern könnten. Nach 30 - 45 min wird das Filterpapier abgezogen. Anschließend werden die Objektträger im Warmluftstrom vollständig getrocknet.

k) Färbung und Entfärbung:

Die Platten werden in einen Plattenhalter eingeordnet und für 10 min in die Färbelösung gegeben. Zur Entfärbung des Untergrundes erfolgt nun ein viermaliger Wechsel der Entfärbebäder. Die an der Luft getrockneten Platten werden nun beschriftet und gegebenenfalls fotografiert.

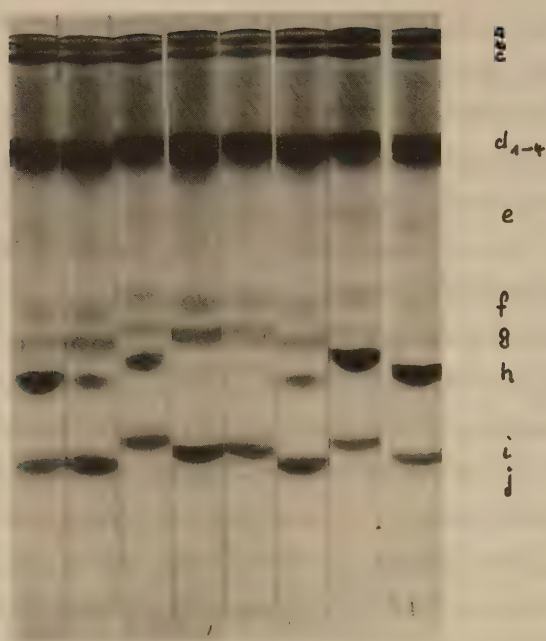
B. ER G E B N I S S E:

1. Diskelektrophoretische Auftrennungen:

a) Normale Drüsensekrete:

Nach Anfärbung mit "Coomassie Brilliant Blue", einer Standardfärbung für Proteine - finden sich bei allen Speichelproben abhängig von Ruhe und Reizzustand der Drüse 13 - 16 Banden (Abb. 1). Es wurden dabei die Banden alphabetisch vom Auftragungspunkt her mit a-j bezeichnet. Bei Ruhe und Reiz zeigen sich folgende charakteristische Veränderungen, die bei allen Patienten unabhängig von Alter und Geschlecht sowie unabhängig vom Zeitpunkt der Speichelabnahme gefunden werden. Die Banden a, b, c werden deutlich schwächer. Ebenso die Zwischenzone zwischen c und der Bandengruppe d_1-4 . Die Bandengruppe d_1-4 , die den Isoamylasen entspricht, wird bei Ascorbinsäurereiz in der Regel breiter und färbt sich intensiver. Die signifikantesten Veränderungen unter Ruhe- und Reizbedingungen jedoch sind im Bereich der Bandengruppe f,g,h,i und j zu sehen. Beim Ruhesekret ist von diesen 5 Banden die h-Bande die stärkste, bei Reiz wird sie zunehmend kleiner und verschwindet fast ganz. Die Banden f und g werden etwas stärker. Die stärkste Bande dieser 5er Gruppe wird die Bande i. Diese Muster der Proteinzusammensetzung, d.h. der elektrophoretischen Auftrennung, wurden bei allen Probanden gefunden.

Abb. 1



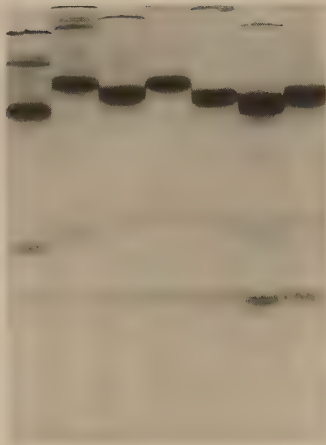
Diskelektrophoretische Auftrennung von gesundem Parotissekret. Die ersten drei Gele von links nach rechts sind Ruhesekret, dann folgen drei Gele Reizsekret und erneut zwei Gele Ruhesekret. Vor allem die charakteristische Bandenveränderung in der Bandengruppe f,g,h, und i bezeichnet, ist ganz deutlich.

b) Pleomorphe Adenome oder Mischtumoren:

Pleomorphe Adenome sind die häufigsten Tumoren der menschlichen Kopfspeicheldrüsen. Sie sind hauptsächlich in der Ohrspeicheldrüse lokalisiert (FOOTE u. FRAZELL, RAUCH, KLEINSASSER) (1%).

Frauen erkrankten häufiger an pleomorphen Adenomen als Männer. Am häufigsten erkrankten die Patienten im 4. Dezenium. Insgesamt wurden 18 Tumorpatienten untersucht. Es waren dabei 12 Frauen und 6 Männer. Das Hautperkrankungsalter lag zwischen 40. und 50. Lebensjahr. Die Sekrete der Drüsen mit pleomorphen Adenom zeigen in der Regel eine abgeschwächte Anfärbbarkeit der Banden, die auf eine geringere Eiweißsekretion zurückzuführen ist. Auffällig ist dabei die deutliche Abschwächung der Zwischenzone c_1 , in der ein Hauptanteil der ausgeschiedenen Glycoproteine sich findet sowie eine Verschmälerung der Isoamylasenbanden. Dagegen stellen sich die anodennahen Banden f, g, h und i etwa gleich stark gegenüber den Normalsekreten dar. Unter Reiz nehmen die Banden a, b, c stark an Farbintensität ab, ebenso die Bandengruppe d_1-4 , die den Amylasen entspricht. Im Gegensatz zu normalen Drüsen zeigt die Ohrspeicheldrüse mit pleomorphem Adenom eine Abnahme der Amylasekonzentration im Reizsekret. Die Bandengruppe f, g, h und i zeigte unter Simulation ein ähnliches Verhalten wie normale Drüsen (Abb.2).

Abb. 2:



Diskelektrophoretische Auftrennung von einer Drüse mit einem pleomorphen Adenom: Von links nach rechts zunächst zwei Gele Ruhesekret, dann drei Gele Reizsekret und erneut zwei Fraktionen Ruhesekret. Auffallend ist die deutlich verminderte Eiweißsekretion.

c) Cystadenolymphome:

Cystadenolymphome, im angelsächsischen Sprachraum auch als Whartin-Tumoren bezeichnet wurden erstmals von ALBRECHT und ARZT (1) als selbständige Tumoren unter der Bezeichnung papilläre Cystadenolymphome beschrieben. Sie kommen am häufigsten in der menschlichen Ohrspeicheldrüse vor. Männer erkrankten 5 mal häufiger als Frauen. Obwohl die Cystadenolymphome nach den pleomorphen Adenomen die zweithäufigsten gutartigen Tumoren sind in der menschlichen Ohrspeicheldrüse, so kommen sie doch weit seltener vor als pleomorphe Adenome in einer Häufigkeit von etwa 6 von 2-6 % aller Ohrspeicheldrüsensentumoren (FOOTE und FRAZELL, KLEINSASSER, RAUCH), (12). Insgesamt wurden 6 Patienten, 4 Männer und 2 Frauen, mit Cystadenolymphomen untersucht. Davon fanden sich bei jeweils einem Mann und einer Frau beidseitige Cystadenolymphome. In der Diselektrophorese finden sich in den kathodennahen Banden a-e keine entscheidenden Veränderungen. In den Banden h-j zeigt sich jedoch eine Zwischenbande hl. Unter Simulation werden die der kathodennahen Banden a, b, c deutlich schwächer. Im anodennahen Gelanteil wird die h-Bande schwächer, die f-Bande stärker, die i- und j-Banden bleiben gleich farbbintensiv (Abb.3).

Abb. 3:



Abbildung 3 zeigt die diskelektrophoretische Auftrennung einer Drüse mit einem Cystadenolymphom. Die h-Bande scheint jedoch breiter und ist zum Teil aufgesplittert.

d) Malignome:

Die bösartigen Ohrspeicheldrüsentumoren können in primär epitheliale, mesenchymale, neurogene und dysontogenetische Tumoren und in sekundäre Tumoren in Form von Metastasen oder invasiv wachsenden Malignomen der Umgebung eingeteilt werden. Insgesamt finden sich dabei etwa 50 verschiedene Tumoren nach der Tumorklassifizierung der Weltgesundheitsorganisation (KLEINSASSER, 1969) (17). Insgesamt wurden 6 Patienten mit Ohrspeicheldrüsenmalignomen untersucht. Es waren dabei 3 Patienten mit Plattenepithelcarcinomen, 2 mit Adenocarcinomen und 1 mit einem Azinuszellcarcinom. Bei allen Malignompatienten zeigten sich die in Abb. 4 gezeigten Veränderungen: Es findet sich eine stärkere Bandenzeichnung der Banden a, b, c und der Zwischenzone cl. Die Amylasenbande dl-4 zeigt keine Intensitätszunahme. Dagegen treten in der Zwischenzone zwischen den Amylasen und der h-Bande mehrere Banden neu auf. Sehr ausgeprägt ist dazu die starke Intensitätszunahme der h-Bande, die dem Albumin entspricht. Die i- und j-Bande im anodennahen Gelbereich zeigt keine Änderungen. Durch die Immunelektrophorese konnte gezeigt werden, daß die Bandenvermehrung bei den Malignompatienten durch eine Serumproteineinschwemmung in den normalen Speichel zustande kommt.

Abb. 4:

Abb. 4 zeigt diskelektrophoretische Auftrennung eines Parotissekretes bei einem Adenocarcinom: Auffallend ist eine starke Vermehrung von Banden, die der vermehrten Einschwemmung von Serumproteinen entspricht.

e) Sialadenitiden:

Entzündliche Kopfspeicheldrüsenerkrankungen können pathogenetisch, ätiologisch und organotrop eingeteilt werden (RAUCH) (7). Insgesamt wurden 12 Patienten mit chronisch entzündlichen Ohrspeicheldrüsenprozessen untersucht. Nach der ätiologischen Einteilung von SEIF ERT (31) handelte es sich dabei um 10 Patienten mit chronisch rezidivierenden Ohrspeicheldrüsenentzündungen und 2 Patienten mit Sjögren-Syndrom. Alle Patienten zeigten bei Sekretabnahme im akuten Entzündungsstadium ein ähnliches Bandenmuster wie in Abb. 6 gezeigt. Die Bandenstruktur ist zwar nicht so ausgeprägt aber ähnlich dem Befund der Malignom-Patienten. Es kommt zu einer Mehrbandenzeichnung, vor allem im mittleren Gelbbereich. Außerdem ist die h-Bande deutlich verbreitert. Auch hier konnte durch die zweidimensionale immunoelektrophoretische Auftrennung gezeigt werden, daß der Bandenzuwachs durch Serumproteine bedingt ist. Wahrscheinlich kommt es durch die Entzündung des Gangsystems zu einer Permeabilitätserhöhung für Serumproteine, die dann in der elektrophoretischen Auftrennung die vermehrten Bandenzeichnungen und die verstärkte h-Bandenzeichnung ergeben, ähnlich wie bei den Malignomen (vergl. Abb. 4).

f) Sialadenosen:

Sialadenosen sind nach SEIF ERT (31): "Nicht entzündliche, parenchymatöse Speicheldrüsenerkrankungen, die auf Stoffwechsel und Sekretionsstörungen des Parenchyms beruhen". Diese Definition des Begriffs Sialadenose, die aufgrund morphologischer Untersuchungen aufgestellt wurde, schränkt den früher von RAUCH (29) als Sialose beschriebenen Krankheitszustand ein. Nach der neueren Definition zählt das Sjögren-Syndrom sowie alle Ohrspeicheldrüsenprozesse, die mit Entzündungsreaktion in der Drüse einhergehen, nicht mehr zu den Sialadenosen. Insgesamt wurden 12 Patienten mit Sialadenosen untersucht. In der Diskelektrophorese fanden sich dabei folgende Befunde: Ähnlich den Drüsen mit pleomorphen Adenomen zeigen auch die durch Stoffwechselstörungen erkrankten Drüsen eine Farbabschwächung fast aller Banden. Infolge der stark verringerten Eiweißausscheidung kommt es dabei vor allem in der d-Bandengruppe zu einer starken Abschwächung. Die Banden a,b,c zeigen eine annähernd normale Struktur. Auch im anodennahen Gelanteil der Banden f, g, h und i kommt es zu einer Abschwächung durch die verminderte Sekretion der Stoffe, ähnlich den pleomorphen Adenomen (vergl. Abb.2).

2. Immunoelektrophoretische Auftrennungen.

a) Normalbefunde:

Bei der zweidimensionalen Auftrennung gegen Antihumanserum und gegen Antiparotissekretserum vom Kaninchen zeigt sich, daß der Hauptanteil der ausgeschiedenen Parotisproteine drüzenspezifisch ist. In der elektrophoretischen Auftrennung gegen Antiparotissekretserum vom Kaninchen (Abb. 5 a) im Vergleich zur Auftrennung gegen Antihumanserum (Abb. 5 b). Bei der zweidimensionalen immunoelektrophoretischen Auftrennung gegen Antiparotissekretserum zeigen sich in der Regel zwei Banden deutlich in der von uns gewählten Auftragskonzentration, das ist einmal die nahe dem Auftragsort liegende Immunglobulin A-Bande und zum anderen die am entferntesten liegende Albuminpräzipitationslinie. Diese zwei Präzipitationslinien konnten durch monospezifische Antiseren indentifiziert werden. Weitere Banden kommen bei Normalsekreten in der gewählten Auftragskonzentration nicht vor.



Abb. 5 a: Zweidimensionale immunoelektrophoretische Auftrennung von menschlichem Parotissekret gegen Antiparotissekretserum vom Kaninchen. Es zeigen sich eine Reihe von Banden. Die meisten Präzipitationslinien sind durch drüsenpezifische Eiweißstoffe verursacht, wie Abb. 5 a zeigt.



Abb. 5 b: Zweidimensionale immunoelektrophoretische Auftrennung von menschlichem Parotissekret gegen Antihumanserum. Es zeigen sich nur zwei Präzipitationslinien in der aufgetragenen Konzentration. Einmal die dem Auftragungspunkt nahe liegende Immunglobulin-A-Bande und die am entferntest liegende Albuminbande.

b) Pleomorphe Adenome:

Im Vergleich zu den zweidimensionalen immunelektrophoretischen Auftrennungen von Normalsekreten, zeigen sich bei den pleomorphen Adenomen keine Veränderungen. Wir finden auch hier wie im Normalsekret zwei Präzipitationslinien, die den der Immunglobulin A- Fraktion und dem Albumin entsprechen. (Abb. 6).

Abb. 6:



Drüsen mit pleomorphen Adenomen zeigen keinen Unterschied zur Auftrennung von Normalsekreten gegen Antihumanserum. Wir sehen wiederum die zwei auch im Normalsekret vorkommenden Präzipitationslinien der Immunglobulin A - und Albuminbande.

c) Cystadenolymphome:

Im Gegensatz zu immunelektrophoretischen Auftrennung von Normalsekreten finden sich zwischen der Immunglobulin A und der Albuminbande zwei weitere Präzipitationslinien. Eine im Bereich der IgA-Präzipitationslinie und eine weitere vor der Albuminpräzipitationslinie. Diese Befunde stimmen mit der diskelektrophoretischen Auftrennung überein, wo sich eine unruhigere Bandenstruktur im anodennahen Gelanteil fand (Abb. 7).



Abb. 7: Zeigt die zweidimensionale immunelektrophoretische Auftrennung von einem Parotissekret bei einem Cystadenolymphom gegen Antihuman-serum. Es finden sich zwei Banden in der Zwischenzone zwischen Immunglobulin A und Albuminbande, die Serumproteinen entsprechen.

d) Malignome:

Die in der Di~~se~~lektrophorese gefundene Bandenvermehrung ist auf Serumproteine zurückzuführen. Eine Reihe von Präzipitationslinien finden sich vergleichsweise zu aufgetrennten Normalsekreten in der Zwischenzone zwischen der IgA und der Albumin-Präzipitationslinie. Sie alle sind durch eine vermehrte Serumproteineinschwemmung in das Speicheldrüsenausführungssystem verursacht. Bis zu 10 Banden sind dabei nachweisbar (vergl. Abb. 8).



Abb. 8: Zweidimensionale immunelektrophoretische Auftrennung von Parotissekret einer Drüse mit einem Malignom gegen Antihumanserum: Es finden sich eine Reihe von Banden zwischen Immunglobulin A und Albumin-Präzipitationslinie, die alle Serumproteinen entsprechen.

e) Sialadenitiden:

Ähnlich dem Befund bei Malignom - Patienten finden wir auch bei den entzündlichen Ohrspeicheldrüsenprozessen eine vermehrte Serumproteineinschwemmung in das normale Drüsensekret. Zwischen den im Normalsekret vorkommenden Banden IgA und Albumin findet sich eine Reihe von Präzipitationslinien, die durch Serumproteine verursacht werden. Die Befunde der diskelektrophoretischen Auftrennung, wo es zu einer vermehrten Bandenzeichnung kommt, können somit durch die zweidimensionale immunelektrophoretische Auftrennung geklärt werden.

(Abb. 9.).



Abb. 9: Zweidimensionale immunoelektrophoretische Auftrennung von Parotissekret der Drüse mit Entzündung gegen Antihumanserum: Auch hier finden wir ähnlich der Drüsen mit Malignomen eine Reihe von Mehrbanden zwischen der Immunglobulin A- und der Albuminbande, die Serumproteinen entsprechen.

f) Sialadenosen:

Wie bei den Normalbefunden und bei den Drüsen mit pleomorphen Adenomen zeigen sich in der zweidimensionalen Immunelektrophorese nur zwei Präzipitationslinien, die dem der Immunglobulin A und der Albumin-Präzipitationslinie entsprechen. Beide Präzipitationslinien sind im Vergleich zum Normalsekret etwas kleiner, was auf die verminderte Sekretion dieser Stoffe zurückzuführen ist. Zu einer Präzipitationslinienzeichnung in der Zwischenzone kommt es nicht (Abb. 10).

8.

Abb. 10: Zweidimensionale elektrophoretische Auftrennung von einer Parotisdrüse mit einer Sialadenose gegen Antihumanserum. Es zeigen sich keine Veränderungen im Vergleich zu normalen Auftrennungen. Es finden sich die beiden Banden Immunglobulin A und Albumin.

C) DISKUSSION DER ERGEBNISSE:

Während in den ersten Publikationen über elektrophoretische Auftrennungen von Parotissekret über Auftrennungen mittels Papier und Cellulose, Azetatfolienelektrophorese berichtet wurde (ZIPPEL) (44) hat sich in der Zwischenzeit die Acrylamidgelelektrophorese als bestes Trennverfahren erwiesen (MAJO und andere (24), SMITH und andere (33), STEINER und andere (34)). Es finden sich dabei in der Auftrennung des Normalsekretes 14-16 Banden, die ein deutliches spezifisches Reizverhalten zeigen, vor allem im anodennahen Gelbereich kommt es zu einer charakteristischen Veränderung der mit f, g, h und i bezeichneten Banden. Übereinstimmend mit den Voruntersuchern finden wir die gleichen Ergebnisse. Auch die zweidimensionalen immunelektrophoretischen Untersuchungen gegen Antihumanserum sowie gegen ein vom Kaninchen hergestelltes Antiparotiseiweißserum zeigen Übereinstimmung mit den von LEVINE und ELLISON (20) gefundenen Untersuchungen. Neu sind die Befunde der Sekretaftrennungen bei Ohrspeicheldrüsenenerkrankungen. Auffällig dabei sind die ähnlichen Veränderungen bei Ohrspeicheldrüsen mit Malignomen sowie bei Ohrspeicheldrüsen mit entzündlichen Prozessen. Bei beiden Patientengruppen kommt es zu einem vermehrten Vorkommen von Serumproteinen. Die in der Diskelektro-

phorese gefundene Bandenmehrzeichnung konnte durch die zweidimensionale immunoelektrophoretische Untersuchung eindeutig als durch Serumproteine verursacht bewiesen werden. Übereinstimmend mit OPPENHEIM und Mitarbeitern (27) konnte in der vorliegenden Arbeit die von OPPENHEIM als Albumin vermutete Bande an gleicher Stelle in der Elektrophorese gefunden werden. Dabei zeigt die h-Bande elektrophoretisch kein unterschiedliches Verhalten zur Serumproteinbande im Gegensatz zur Meinung von MCKEAN und Mitarbeitern (16), die berichten, daß das Serum Albulin sich anders als das Speicheldrüsenalbumin verhalte.

Dagegen finden sich bei den pleomorphen Adenomen sowie den Sialadenosen verminderte Bandenstrukturen in der Diskelektrophorese, die auf eine verminderte Eiweißsekretion zurückzuführen sind. In der immunoelektrophoretischen Auftrennung zeigt sich bei beiden Krankheitsbildern keine Veränderung zur Normalsekretetauftrennung. Bei den Cystadenolymphomen zeigt sich eine unruhigere Bandenzeichnung im Bereich der f,g,h und i-Bandengruppe. Durch die Immunelektrophorese konnte gezeigt werden, daß ein bis zwei Präzipitationslinien in der Zwischenzone zwischen der Immunglobulin A und der Albumin-Präzipitationslinie vorkommen, die ebenfalls Serumprotein-bedingt sind.

Zusammenfassend ermöglicht somit die Diskelektrophorese in Verbindung mit der immunelektrophoretischen Auftrennung eine Differentialdiagnose innerhalb der gut- und bösartigen Tumoren, sowie in der Differentialdiagnose Sialadenitis zu Sialadenose.

IV. ZUSAMMENFASSUNG:

Ausgehend von der disk- und immunelektrophoretischen Auftrennung von 20 Normalsekreten werden im Anschluss daran die Sekrete von 30 Patienten mit Ohrspeicheldrüsentumoren, 12 Patienten mit entzündlichen Ohrspeicheldrüsenprozessen sowie 12 Patienten mit Stoffwechsel-bedingten Ohrspeicheldrüsenenerkrankungen (Sialadenosen) untersucht. Es finden sich dabei charakteristische Veränderungen sowohl in der disk- als auch in der Immunelektrophorese innerhalb der einzelnen Krankheitsbilder. Auffällig ist eine vermehrte Serumprotein-ausscheidung im Speichel bei entzündlichen Ohrspeicheldrüsenenerkrankungen sowie bei bösartigen Tumoren. Durch die Disk- und Immunelektrophorese scheint eine differentialdiagnostische Untersuchungsmöglichkeit in den Krankheitsbildern der menschlichen Ohrspeicheldrüse möglich.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALBRECHT, H., ARZT L: Beiträge zur Frage der Gewebsverirrung. Papilläre Cystadenome in Lymphdrüsen. Z. Path. 4 (1910) 47.
- 2) ARMSTRONG, W.G.: 1971. Characterization studies on the specific human salivary proteins absorbed in vitro by hydroxyapatite. Caries. Res. 5, 215-227 .
- 3) BALEKJIAN, A.Y., HOERMAN, K.G. and BERZINSKAS, V.J.: 1969. Lysozyme of the human parotid secretion: Its purification and physiochemical properties. Biochem. biophys. res. Commun. 35, 887-894.
- 4) BRANDTZAEG, P.: 1971. Human secretory immunoglobulins. VII. Concentrations of parotid IgA other secretory proteins in relation on the rate of flow and duration of secretory stimulus. Archs. oral. Biol. 16, 1295-1310 .
- 5) CALDWELL, R.C. and PIGMAN, W., 1965: Discelektrophoresis of human saliva in polyacrylamide gel. Archs Biochem. Biophys. 110, 91-96.

- 6) CHAUNCEY, H.H., LIONETTI, F., WINER, R.A. and LISANTI, VF, 1954: Enzymes of human saliva.
I. The determination, distribution and origin of whole saliva enzymes.
J. dent. Res. 33, 321-334.
- 7) CLARKE, M.H.G. and FREEMAN, T. 1968: Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins.
Clin. Sci. 35, 403.
- 8) D'SILVA, J.L. and FERGUSON, D.B. 1962:
Zone electrophoresis of human parotid saliva in various media. Archs oral Biol. 7, 563-571.
- 9) ELLISON S.A., 1966: Salivary antigens.
J. dent. Res. 45, 644-654.
- 10) ENGLHARDT, A. und LOMMEL H.: Serumproteine Band 1.
Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- 11) FERGUSON, M.H., KRAHN, H.P., HILDES, J.A. 1958:
Parotid secretion of proteinin man.
Can. J. biochem. Physiol. 36, 1001-1008.
- 12) FOOTE, F.W., FRAZELL, E.L., 1953: Tumors of major salivary glands.
Cancer 6, 1065.

- 13) GELLER.H.J., HANES L. ROVELSTAD, H., 1959:
Electrophoresis of saliva.
J.dent.Res. 38, 854-859.
- 14) GIFFORD, G.T. and YUKNIS, L., 1965: Protein pat-
terns in human parotid saliva.
J. Chromatogr. 20, 150-153.
- 15) KAUFFMAN, D.L., ZAGER, N.I., COHEN, E., KELLER
P.J., 1970: The isoenzymes of human parotid saliva.
Archs biochem. Biophys. 137, 325-339.
- 16) MC KEAN, F.J., J.A.BEELEY: Immunological studies on
human salivary albumin, Archs. oral. Biol.Vol. 19
(1974), 103.
- 17) KLEINSASSER, O.: Einteilung, Morphologie und Ver-
halten der epithelialen Speicheldrüsentumoren,
H.N.O. (Berl.) 17 (1969).
- 18) KOHLRAUSCH, F., (1897): Ann. Physik und Chemie 62,
209 (Zitiert nach 30) MAURER, H.R.: Diskelektro-
phorese.
- 19) LAURELL, C.B., 1965 : Antigen-antibody crossed
electrophoresis. Anal. Biochen. 10, 358.
- 20) LEVINE, M.J. and ELLISON, S.A., 1973 : Immunelec-
trophoresis and chemical analyses of human parotid
saliva.
Archs oral Bioö 18, 839-853.

- 21) MANDEL, I.D. and ELLISON, S.A., 1961: Characterization of salivary components separated by paper electrophoresis. *Archs. oral Biol.* 3, 77 - 85.
- 22) MANDEL, I.D. and ELLISON, S.A., 1965: Organic components of human parotid and submaxillary saliva. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 131, 802-811.
- 23) MASSON, P.L., CARBONARA, A.O. and HEREMANS, J.F., 1965: Studies on the proteins of human saliva. *Biochem. Biophys. Acta*, 107, 144-145.
- 24) MAYO, J.W., CARLSON, D.M., 1974 : Protein composition of human submandibular secretions. *Archs. Biochem. Biophys.* 161, 134.
- 25) MEYER, T.S. and LAMBERTS, B.L., 1965 : Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide gel strips. *Biochem, Biophys. Acta* 107, 144-145.
- 26) MORIYA, H. YAMAZAKI, K. and FUKUSHIMA, H., 1965: Biochemical studies on kallikreins and their related substances. I. Isolation and purification of human saliva kallikrein. *J. Biochem. Tokyo* 58, 201-209.

- 27) OPPENHEIM, F.,G.,: Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva, *Helv.odont. Acta* 14 (1970), 10.
- 28) PATTON, J.R., and PIGMAN, W., 1959: Electrophoretic and ultracentrifugal components of human salivary secretion.
J. Am. chem. Soc. 81. 3035- 3039.
- 29) RAUCH, S.,: Die Speicheldrüsen des Menschen.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1959.
- 30) RESSLER, N., 1960: Two-dimensional electrophoresis of serum protein antigens in an antibody containing buffer.
Clin. chem. Acta 5, 795.
- 31) SEIFERT, G., : Die Mundspeicheldrüsen aus Doerr Uehlinger
Spezielle patho. Anatomie Bd. I. Springer Verlag
(1966), 161.
- 32) SIMONS, K., T. , WEBER,T. STIEL, M. and GRASBECK,R.,:
1964: Immunelectrophoresis of human saliva.
Acta med. scand. Suppl. 412, 257 - 264.

- 33) SMITH, Q.T., u.a., 1974: Polyacrylamidgel slab electrophoresis of human salivary proteine. Arch. oral. Biol. 3 407.
- 34) STEINER, J.C. and KELLER, P.J., 1968: An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. Archs oral Biol. 13, 1213-1221.
- 35) STEPHAN und FRAHM, 1971: Quantitative Simultan-Immunoelektrophorese, Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 9, 224-228.
- 36) STOFFER, H.R., KRAUS, F.W., HOLMES, A.C., 1962: Immunochemical identification of salivary protein. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111, 467-471.
- 37) TOMASI, T.B. and ZIGELBAUM, S., 1963: The selective occurrence of IgA-globulins in certain body fluids. J. clin. Invest. 42, 1553-60.
- 38) TOMASI, T.B. and BIENENSTOCK, J., 1968: Secretory immunoglobulins. In: Advance in Immunology (edited by DIXON, F.J. and KUNKEL). Vol. 9, pp. 2-96. Academic Press, New York.
- 39) WEINSTEIN, E., HESKINS, D., JACKSON, S.W. 1960: An improved technique for the paper electrophoresis of parotid saliva. J. dent. Res. 39, 110-115.

- 40) WEISS, I.T. and HABER, N. 1964: Evaluation of paper electropherograms of parotid saliva.
J. dent. Res. 43, 652-658.
- 41) WOLF, R.O. and TAYLOR, L.L., 1964: A comparative study of saliva protein analysis.
Archs oral Biol. 9, 135-140.
- 42) WOLF, R.O. and TAYLOR, L.L., 1967: Isoamylase of human parotid saliva.
Nature, Lond. 213, 1128-1129.
- 43) ZIPKIN, I., ADAMIK, E.R., SAROFF, H.A., 1957: Boundary electrophoresis of human parotid saliva.
Proc. Soc. exp. Biol. 95, 69-71.
- 44) ZIPPEL, R., MEYER, P., BIETZ G., 1968: Elektrophorese des Parotissekrets. II. Mitteilung: Membranfolienelektrophorese.
Z.Laryngol. Rhinol. 47, 891.

L e b e n s l a u f

Am 11. Oktober 1945 wurde ich als 7. Kind des Notariatsamtmanns Erwin Kerscher und seiner Ehefrau Barbara geb. Pöschl, in Moosburg geboren.

Meine Schulausbildung erfolgte an der Volksschule Moosburg und am Domgymnasium Freising, wo ich 1967 das Abitur erlangte.

1967 - 1970 leistete ich meinen Wehrdienst bei den Pionieren ab, wo ich als Leutnant der Reserve ausschied.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und approbierte hier am 4. März 1976 zum Zahnarzt.

Seit April 1976 bis April 1978 besteht ein Arbeits-Verhältnis als Assistenzzahnarzt.

